

## 研究会だより

## 第57回岡山実験動物研究会

平成21年7月10日(金)午後1時30分から午後5時20分まで岡山大学工学部・6号館12番講義室で大森 斉先生のお世話で開催された。はじめに、会長の三谷恵一先生から開会のあいさつがあり、その後特別講演に移った。特別講演は「線虫 *C. エレガンス* の遺伝子と遺伝子の虫」と題して香川弘昭先生(岡山大学名誉教授)が講演された。この氏会は大森 斉先生(岡山大学大学院自然科学研究科)が担当された。講演終了後、休憩を取った後に一般講演に移った。一般講演1は「消化管での糖の吸収メカニズムと消化管内の流れの関係」と題して高橋 徹先生(美作大学大学院生活科学研究科)が講演された。この司会は河田哲典先生(岡山大学大学院自然科学研究科)が担当された。一般講演2は「IL-21の抗体の親和性成熟における新規な役割: ノックアウトマウスを用いた解析」と題して藤井康正氏(岡山大学大学院自然科学研究科・細胞機能設計学)が講演された。司会は浅田伸彦先生(岡山理科大学理学部)が担当された。一般講演3は「マウスの皮膚ならびに鼻アレルギーモデルに対するプロポリスの影響」と題して神名祥史氏(岡山大学薬学部・薬効解析)が講演された。司会は嶋村三智也氏(榊クラレ くらしき研究所)が担当された。一般講演4は「高脂肪食がALS系マウスの体重ならびに糖尿病病態に及ぼす影響」と題して周 徹氏(岡山大学大学院自然科学研究科)が講演した。司会は内藤一郎先生(新見公立短期大学)が担当された。一般講演5は「精子形成が減数分裂第一分裂前期で停止するENU誘発突然変異 repro23 マウスの解析」と題して浅野友香氏ら(岡山大学大学院自然科学研究科)が講演した。司会是高橋純夫先生(岡山大学大学院自然科学研究科)が担当された。一般講演終了後、事務局から会務報告があった。会務報告は平成21年度第1回理事会の記載内容を参照下さい。

講演終了後、岡山大学津島キャンパス ピーチユニオン 4F で懇親会が持たれ、講師の先生を囲んで会員相互の親睦を深めた。

## 特別講演

線虫 *C. エレガンス* の遺伝子と遺伝子の虫

香川 弘昭

岡山大学名誉教授(理学部)

2001年の本研究会(会報18, 23-28)で「線虫は、遺伝子から細胞そして動物個体まで観察できる良

いモデル生物である」と書きました。その後、ノーベル医学生理学賞が02年線虫モデルと細胞死、06年のRNA干渉について、線虫研究者の計5名に、昨年の化学賞がGFPの生体内発現についての研究で1名が加わりました。現在ではRNA干渉やGFP(蛍光タンパク質)を用いた細胞内局在の技術が他分野でも広く利用されています。そして、細胞死、ガン(異常細胞増殖)、アルツハイマー症、肥満などのヒトの病気についての研究も盛んになってきました。私が細菌のベン毛形成から、行動異常線虫の原因遺伝子である筋肉の遺伝子のクローニングと塩基配列決定、遺伝子発現について研究してきた過程を中心にして今後の展望も話します。

実験医学(2009)27, 583-587

## 細菌から線虫へ

岡山大学農学部で「硫黄細菌の末端電子伝達系で働くシトクロームの単離精製」を行い、pH2以下で生息する硫黄の細菌内が中性である事に驚きました。名古屋大学大学院では分子モーターで最も簡単なサルモネラ菌のベン毛タンパク質の分子集合について、生化学、免疫抗体や電子顕微鏡を使った物理化学的研究をしました。学位を取得後2年間の学振研究員を経て助手になり、懸案の課題を解決すべく、多量にタンパク質を作る突然変異体の利用から、その遺伝子DNAの研究へと進展していきました。新しい技術の取得はより複雑な問題の解決を可能にします。

## 遺伝子DNAから遺伝子発現そしてゲノム科学へ

岡山大学理学部に移って遺伝子、遺伝産物の量と生物機能の関係が課題になりました。機会をえてイギリスのMRC分子生物学研究所で2年間「線虫の分子生物学」を学びました。突然変異を起こした原因遺伝子のクローニングと塩基配列決定から、個体の行動異常と遺伝子の因果関係を明らかにする事です。より複雑な系も細菌で学んだ分子生物学的研究手法が役立ちました。分子モーターの部品タンパク質遺伝子の解明、組織や時期特異的な遺伝子発現を決める要因については、併行して進められた線虫のゲノム解析や細胞系譜の成果に助けられました。

## 定年を前に高校生との対話から

SSH(Super Science High-school)に出向いて最近の研究成果を話す授業で、高校生に「虫の仲間」を挙げてもらったところ、「蛙・蛇・蝙蝠に加えて、虹」が出てきました。虹が虫の仲間なら食べ物は草の仲間ではないかと考えてみると「夢」が出てきました。昔の人はよく考えていたようです。生き物の多様性は人間生活も豊かにするようです。

## 一般講演 1.

### 消化管での糖の吸収メカニズムと 消化管内の流れの関係

高橋 徹  
美作大学大学院

消化管内での糖の移動は糖の吸収全体を規定する可能性がある。糖の移動は2通りの移動方法が考えられる。乱流による非常に早い移動と自己拡散による遅い移動である。もし、消化管内が乱流であれば消化管内の混合は非常に早いため粘膜の経皮輸送速度が吸収速度の律速段階になる。一方で、消化管内が層流であれば糖の消化管内の移動は自己拡散による非常に遅い移動になるため、糖の自己拡散速度が糖の吸収速度の律速段階になると考えられる。したがって、消化管内の流れと消化管内の糖の移動を明らかにすることで、消化管内の糖の移動と糖の吸収メカニズムの一端を明らかにすることができる。そのため、消化管内の流れを計算し、消化管内の糖の移動を考察した。次いで、消化管内の糖の偏在性を測定し、糖の吸収メカニズムを考察した。

#### 方法

#### 実験 1. レイノルズ数の計算

分節運動や蠕動運動によって起こる流速と消化管内容物の粘度と密度からハーゲン・ポアズイユの法則を展開して非ニュートン流体用のレイノルズ数を計算した。レイノルズ数は層流と乱流のどちらかが存在するかを示す指標であり、管の中の流れの場合 2300 以上で乱流になる。

#### 実験 2. 消化管内の糖の偏在性

消化管の径が大きいスunksを用いた。胃の対照モデル内容物を CMC20 mg/ml とグルコース 50 mg/ml 水溶液から調整した。結晶セルロース 10% 添加したものも設定した。ずり速度  $10 \text{ s}^{-1}$  の場合の粘度はそれぞれ 880 と  $490 \text{ mPa s}$  であった。これらの内容物モデルを、一晚絶食させたスunksの十二指腸に注入し、イソフルラン麻酔下で 15 分静置した。内容物モデルの注入には、シリコンチューブを挿入して末端を十二指腸に開口し、ペリスタポンプを用いて流速  $0.6 \text{ mL/min}$ 、注入時間 5 分間の条件で行った。屠殺後 20 秒以内に採取した消化管をドライアイスで凍結させた。消化管から近位、中位、遠位の横断切片をクリオスタットで作製した。凍結切片作製後、消化管内容物中の中心部と外縁部に分けて採取して、グルコース濃度をグルコース CII (Wako) で測定した。

#### 結果および考察

消化管内の流れのレイノルズ数の計算結果、ブタ、ニワトリ、ヒトで、小腸では 5 以下、大腸で

は 0.2 以下であり、いずれの種においても安定した層流であると考えられる。この結果から、消化管内には直径方向の糖の偏在がある可能性がある。

消化管内の糖の偏在性を測定した結果については、セルロース添加、長軸方向上の位置、横断方向上の位置を要因とした三元分散分析を行った。二元と三元の交互作用は認められなかった。セルロース添加によってグルコース濃度が上昇し ( $p=0.02$ )、中心部は外縁部よりもグルコース濃度が高いことが示された ( $p=0.0002$ )。すなわち、消化管内では糖が自己拡散で移動しており、自己拡散の速度は粘度に影響を受ける可能性を示している。

以上のことから、消化管内の糖の移動が自己拡散によること、自己拡散速度は消化管内容物の粘度上昇によって遅くすることができることが示された。この結果は消化管内容物の粘度上昇で糖吸収速度を緩和できるというこれまでの研究と矛盾しない。

## 一般講演 2.

### IL-21の抗体の親和性成熟における新規な役割： ノックアウトマウスを用いた解析

藤井 康正、西尾 祐美、西川 裕美子、金山 直樹、  
曲 正樹、大森 斉  
岡山大学大学院自然科学研究科 細胞機能設計学

免疫後、時間と共に抗体の抗原に対する結合親和性が上昇する、いわゆる親和性成熟は、抗体可変部遺伝子の高頻度突然変異と変異により高親和性を獲得した B 細胞の選択により起こるとされている。B 細胞の選択はリンパ組織に形成された胚中心内で、濾胞樹状細胞(FDC)、濾胞ヘルパーT細胞(Tfh)との相互作用を通して行われるが、その機構には不明な点が多い。我々はマウスからこれまで培養困難であった FDC の細胞株 FL-Y の樹立に成功した 2)。FL-Y は FDC の多くの表現型を保持しており、FDC の機能を *In vitro* で解析する有用なツールとなる。FL-Y と B 細胞の共培養系での解析により以下の点が明らかとなった。

Tfh から由来するサイトカイン IL-21 存在下で、B 細胞がヘルパーT 細胞からの生存シグナルを受け取れない場合は(即ち低親和性 B 細胞の場合)、FDC 由来の可溶性因子の刺激により、アポトーシスに陥る。

このアポトーシスは、Tfh からの CD40 を介する刺激が入ると(即ち高親和性 B 細胞の場合)回避され、B 細胞は生存、増殖する。

これらの知見は従来言われている FDC 上での B 細胞の正の選択の他に、不要な B 細胞を除去する IL-21 に依存する負の選択機構が存在すること

を示唆する。

IL-21 のこのような役割を個体レベルで明らかにするために、IL-21receptor ノックアウトマウス (IL-21R-KO) を用いて、親和性成熟を解析した。

NP 化ニワトリガンマグロブリンで免疫し、抗 NP 抗体の親和性成熟を調べたところ、野生型マウスに比べて、IL-21-KO では有意に親和性成熟が抑制されていた。以上より、IL-21 の親和性成熟における新規な役割が明らかとなった。

現在、詳細な機構について更に検討中である。

- 1) 現所属：徳島大学疾患酵素学研究センター (免疫病態研究部門)
- 2) Nishikawa, Y., et al. J. Immunol. 177, 5204-5214 (2006).

### 一般講演 3.

#### マウスの皮膚ならびに鼻アレルギーモデルに対するプロボリスの影響

神名 祥史、矢野 春奈、香川 陽人、亀井 千晃  
岡山大学・薬学部・薬効解析

プロボリスは、古くから民間の伝承薬として使用されており、種々の薬理作用を示すことが判明している。プロボリスの抗アレルギー作用については、ラットの腹腔マスト細胞からのヒスタミン遊離に対して抑制作用を示すという報告があるが、実際に実験動物のアレルギーモデルを用いた試験でもプロボリスが抗アレルギー効果を示す可能性が考えられる。

そこで、プロボリスの抗アレルギー作用について検討する目的で、種々の搔痒惹起物質を用いて、マウスの皮膚アレルギーモデルに対するプロボリスの経口投与による効果を検討した。次に、プロボリスのエタノール抽出物 (プロボリスチンキ) を用いて皮膚アレルギーモデルに対する塗布投与による効果を検討した。さらに、マウスを用いた能動感作による鼻アレルギーモデルに対するプロボリス経口投与の効果を検討した。

その結果、プロボリスは単回投与により、compound 48/80 誘発引掻き行動に対して抑制効果を示した。また、この効果は連続投与することにより増強された。一方、ヒスタミンおよびセロトニン誘発引掻き行動に対しては抑制効果を示さなかった。塗布投与した場合には、プロボリスは compound 48/80 皮内投与の直前、15 分、30 分および 60 分前のいずれの塗布時期においても抑制効果を示した。一方、ヒスタミン誘発引掻き行動に対しては、皮内投与の直前に塗布投与し

た場合には抑制効果を示したが、15 分、30 分および 60 分前に塗布投与した場合には有意な効果は示さなかった。さらに、プロボリスは能動感作による鼻アレルギー症状に対し、連続投与することで有意な抑制効果を示した。しかし、ヒスタミン誘発鼻アレルギー症状に対しては抑制効果を示さず、能動感作による血清総 IgE 量の上昇に対しても有意な効果を示さなかった。一方、ラットの腹腔マスト細胞を用いた試験において、プロボリスは、compound 48/80 および抗原誘発によるヒスタミン遊離のいずれに対しても抑制効果を示すことが確認された。

### 一般講演 4.

#### 高脂肪食が ALS 系マウスの体重ならびに糖尿病病態に及ぼす影響

周 薇、国枝 哲夫、佐藤 勝紀  
岡山大学大学院自然科学研究科

【目的】肥満およびそれに伴う糖尿病は生活習慣病として位置付けられ、その発症は遺伝要因および過食、高カロリー食摂取や運動不足などの環境要因に起因している。本研究で用いる ALS 系マウスは実験的糖尿病モデル動物として作出され、アロキサン誘発糖尿病に対して感受性を示す。ALS 系マウスは肥満遺伝子 (Ay) の導入や MSA (Monosodium-L-aspartate) の投与による肥満誘導によって糖尿病を発症することが明らかにされているが、食餌による肥満誘導と糖尿病発症については検討されていない。本研究は高脂肪食が ALS 系マウスの体重ならびに糖尿病病態に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】ALS 系の雌雄を用いて、高脂肪食 (AIN-93G 標準飼料を基にして 40% 脂肪含量に調整) および対照食 (AIN-93G 標準飼料) を 4 週齢から 20 週齢まで給餌し、体重、摂餌水量、尿糖、血糖値について経時的に測定した。また、8、14、20 週齢時に耐糖能試験を行った。さらに、20 週齢時で解剖し、腹腔内脂肪、膵臓、肝臓の重量を測定した。腹腔内脂肪は生殖器周囲脂肪、腎周囲脂肪、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪の 4 つを取り上げた。膵臓はブアン固定後、肝臓は 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン固定後、各々パラフィン包埋を行い 4μm の切片を作成した。膵組織はアルデヒド・フクシン染色、肝組織はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。尿糖はダイアスチックスを用い、+ (0.25g/dl) 以上を尿糖陽性として判定した。血糖値は尾静脈の末梢血についてグルテストセンサーを用いて測定した。耐糖能試験はブドウ糖液 (2g/kg) を経口

投与し、投与直前 (0 分) および投与後 30、60、120 分後の血糖値の測定によって行った。

【結果】高脂肪食での体重は雌雄とも 5 週齢から有意に高い値を示し、その差は週齢に伴い増大した。20 週齢の体重についてみると、雄では高脂肪食 52.6g、対照食 37.3g、雌では高脂肪食 45.8g、対照食 28.4g の値を示した。摂餌量は雌雄とも高脂肪食と対照食の間に大きな差は認められなかった。血糖値は高脂肪食の雄では対照食に比べて 5 週齢から有意に高い値となり、8 週齢以降その差は増大し、20 週齢では各々 441.6、123.7mg/dl の値を示した。一方、雌では雄のような高脂肪食による血糖値の上昇はみられなかったが、高脂肪食は対照食より高い値を示す傾向がみられた。高脂肪食での糖尿病の発症は雄の 10 週齢時で初めてみられ、それ以降の発症率は直線的に増加し、18 週齢で 100% となり、その値は 20 週齢まで維持された。耐糖能試験の結果、高脂肪食での雄では週齢に伴い耐糖能は低下することが認められた。腹腔内脂肪量は雄では高脂肪食 4.3g、対照食 2.7g、雌では高脂肪食 6.0g、対照食 1.3g となり、いずれも有意な差が認められた。腹腔内脂肪を構成する 4 つの脂肪の重量についてみると、雄では腎周囲脂肪と腸間膜脂肪が有意に高く、雌ではいずれの脂肪も有意に高い値を示した。相対値 (%) でみても同様の結果となった。膵臓重量は雄では高脂肪食が有意に高く、肝臓重量は雌雄ともに高脂肪食で有意に高い値を示した。膵組織の観察結果、雄ではラ氏島の数や面積において有意差が見られ、高脂肪食では高い値を示した。しかし、雌では有意な差は認められなかった。また、高脂肪食での雄の肝組織では脂肪肝が多くみられた。

以上のことより、高脂肪食によって ALS 系マウスは雌雄ともに肥満が誘導され、雄のみに糖尿病が発症すること、および糖尿病病態は肥満に伴い重篤になることが明らかとなった。

## 一般講演 5.

### 精子形成が減数分裂第一分裂前期で停止する ENU 誘発突然変異 *repro23* マウスの解析

浅野 友香<sup>1)</sup>、野口 純子<sup>2)</sup>、秋山 耕陽<sup>1)</sup>、  
辻 岳人<sup>1)</sup>、国枝 哲夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>岡山大学大学院自然科学研究科、<sup>2)</sup>(独)農業生物資源研究所

【目的】*repro23* マウスは、ジャクソン研究所における生殖ゲノミクス計画において作出された精子形成異常を呈する ENU 誘発突然変異マウスであ

る。*repro23* ホモ雄個体は、精巣が著しく小さく精子形成がパキテン期で停止することが報告されているが、その詳細な表現型は明らかにされていない。また *repro23* 遺伝子座は、マウス第 7 染色体上に位置付けられているが原因遺伝子は同定されていない。そこで本研究では、*repro23* ホモ個体の詳細な表現型解析及び原因遺伝子同定を行なった。

【材料及び方法】正常個体と *repro23* ホモ個体の体重および生殖巣の重さを測定した。また、精巣の組織学的解析では、精巣組織をブアン固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色、Anti- $\gamma$  H2AX 抗体を用いた免疫染色、アポトーシス細胞検出のための TUNEL 染色を行い、また生殖細胞を表面展開法により固定し Anti-SCP3 抗体と Anti- $\gamma$  H2AX 抗体を用いた蛍光免疫染色を行なった。遺伝子の発現解析では、精巣から RNA を抽出し cDNA の合成を行い、精子形成過程に特異的な各種遺伝子をマーカーとして用い半定量的 RT-PCR 法を行なった。また、JF1/Ms との交配により得られた F2 個体を用いた連鎖解析により *repro23* 遺伝子座の染色体上の位置の特定を試みた。また、精巣の cDNA またはゲノム DNA を用いて PCR 法によりクローニングし、原因遺伝子の変異配列の同定を行なった。

【結果及び考察】正常個体と *repro23* ホモ個体の体重および生殖巣の重さを測定したところ、ホモ個体では正常個体の精巣と比較して約 30% 程度の大きさとなっていた。また精巣の組織学的解析を行なったところ HE では、*repro23* ホモ個体の精細管内で精子形成における減数分裂第一分裂前期パキテン期以降の生殖細胞は観察されず、またクロマチン凝集体様の構造をもつ精母細胞内に多数観察され、幾つかの精細管では顕著な空胞化が観察された。表面展開法を用いた蛍光免疫染色では、減数分裂第一分裂前期パキテン期以降の生殖細胞は認められず、パキテン期細胞も極めてまれであり、この少数のパキテン期細胞の殆どで XY body における X-Y 染色体の対合の異常が観察された。また、クロマチン凝集体様構造をもつ精母細胞は、 $\gamma$  H2AX 抗体に強反応性を示し、ザイゴテン期の細胞と考えられたが、この細胞は TUNEL 法によるアポトーシス陽性反応は認められなかった。さらに、半定量的 RT-PCR 法によっても、正常ではパキテン期以降に発現する遺伝子



③ 平成 20 年度 (1 月 1 日～12 月 31 日) の会計収  
支決算報告: 収入の部として前年度繰越金 367,574  
円、会費 54,000 円、賛助会費 360,000 円、寄付  
33,000 円、日本生物工学会西日本支部 20,000 円、  
郵便貯金利子 143 円となり、総額 834,717 円、一  
方、支出の部として印刷費 (第 24 号会報) 178,500  
円、通信費 30,420 円、第 55 回研究会謝金 80,000  
円、補助 40,000 円、第 56 回研究会謝金 40,000 円、  
補助 70,000 円、雑費 37,000 円となり、支出総額  
は 475,920 円で、残高は 358,797 円であった。会

